

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/000313

International filing date: 13 January 2005 (13.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-007278
Filing date: 14 January 2004 (14.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 24 March 2005 (24.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in
compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

31.1.2005

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2004年 1月14日
Date of Application:

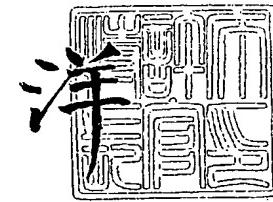
出願番号 特願2004-007278
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP2004-007278]

出願人 月桂冠株式会社
Applicant(s):

2005年 3月 9日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



出証番号 出証特2005-3019939

【書類名】 特許願
 【整理番号】 6502003JP
 【提出日】 平成16年 1月14日
 【あて先】 特許庁長官殿
 【国際特許分類】 C12N 15/00
 【発明者】
 【住所又は居所】 京都府京都市伏見区下鳥羽小柳町24 月桂冠株式会社総合研究所内
 【氏名】 鈴木 佐知子
 【発明者】
 【住所又は居所】 京都府京都市伏見区片原町300 月桂冠株式会社総合研究所内
 【氏名】 福田 克治
 【発明者】
 【住所又は居所】 京都府京都市伏見区片原町300 月桂冠株式会社総合研究所内
 【氏名】 入江 元子
 【発明者】
 【住所又は居所】 京都府京都市伏見区片原町300 月桂冠株式会社総合研究所内
 【氏名】 秦 洋二
 【発明者】
 【住所又は居所】 京都府京都市伏見区下鳥羽小柳町24 月桂冠株式会社総合研究所内
 【氏名】 川戸 章嗣
 【発明者】
 【住所又は居所】 京都府京都市伏見区片原町300 月桂冠株式会社内
 【氏名】 安部 康久
 【特許出願人】
 【識別番号】 000165251
 【氏名又は名称】 月桂冠株式会社
 【代理人】
 【識別番号】 100065215
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 三枝 英二
 【電話番号】 06-6203-0941
 【選任した代理人】
 【識別番号】 100076510
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 掛樋 悠路
 【選任した代理人】
 【識別番号】 100086427
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 小原 健志
 【選任した代理人】
 【識別番号】 100099988
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 斎藤 健治
 【選任した代理人】
 【識別番号】 100105821
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 藤井 淳

【選任した代理人】

【識別番号】 100099911

【弁理士】

【氏名又は名称】 関 仁士

【選任した代理人】

【識別番号】 100108084

【弁理士】

【氏名又は名称】 中野 瞳子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 001616

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 特許請求の範囲 1

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

シデロフォアと3価鉄イオンとを含む鉄補給剤。

【請求項 2】

シデロフォアと3価鉄イオンとがキレート錯体の形態で含まれている請求項1に記載の鉄補給剤。

【請求項 3】

シデロフォアがヒドロキサム酸を含むものである請求項1又は2に記載の鉄補給剤。

【請求項 4】

シデロフォアの3価鉄キレート錯体がフェリクローム類である請求項3に記載の鉄補給剤。

【請求項 5】

フェリクローム類がフェリクリシンである請求項4に記載の鉄補給剤。

【請求項 6】

シデロフォアと3価鉄イオンとを含む鉄欠乏性貧血の予防、改善又は治療剤。

【請求項 7】

シデロフォアと3価鉄イオンとがキレート錯体の形態で含まれている請求項6に記載の鉄欠乏性貧血の予防、改善又は治療剤。

【請求項 8】

シデロフォアがヒドロキサム酸を含むものである請求項6又は7に記載の鉄欠乏性貧血の予防、改善又は治療剤。

【請求項 9】

シデロフォアの3価鉄キレート錯体がフェリクローム類である請求項8に記載の鉄欠乏性貧血の予防、改善又は治療剤。

【請求項 10】

フェリクローム類がフェリクリシンである請求項9に記載の鉄欠乏性貧血の予防、改善又は治療剤。

【請求項 11】

シデロフォアと3価鉄イオンとを含む食品添加剤。

【請求項 12】

シデロフォアと3価鉄イオンとがキレート錯体の形態で含まれている請求項11に記載の食品添加剤。

【請求項 13】

請求項1～5のいずれかに記載の鉄補給剤を含む食品組成物。

【請求項 14】

請求項1～5のいずれかに記載の鉄補給剤を含む医薬組成物。

【請求項 15】

請求項1～5のいずれかに記載の鉄補給剤を含む鉄欠乏性貧血の予防、改善又は治療用組成物。

【書類名】明細書

【発明の名称】鉄補給剤及びその利用

【技術分野】

【0001】

本発明は、フェリクローム類をはじめとする各種シデロフォアを利用した鉄補給剤、特に鉄欠乏性貧血の改善および予防用の鉄補給剤、それを含む医薬又は食品組成物に関するものである。

【背景技術】

【0002】

近年、日本人の食生活及び健康に対する意識は高くなり、食品に安全性及び機能性が求められるようになってきた。通常の食事で不足する成分を補うため栄養補助食品などを摂取する人の割合もますます増えてきている。一方、国民栄養調査によると、鉄の平均摂取量は性別や年代に関係なく、所要量を下回る状態が続いている。また、鉄は吸収率が低く、摂取した量のほとんどが排泄されてしまうことが知られている。このことから、鉄は積極的に摂取する必要がある栄養素のひとつである。

鉄が不足した状態が長く続くと鉄欠乏性貧血になるばかりでなく、運動及び学習能力が低下したり、免疫力が低下するなど、人体に様々な悪影響を及ぼす。鉄欠乏性貧血を改善するには、一般に、ヒトが吸収し易いヘム鉄を多く含む畜肉又は魚類を摂取することが有効といわれている。しかし、畜肉又は魚類を多量に摂取するには食習慣を大きく変える必要があり、またこれらを過剰に摂取すると栄養のバランスが悪くなる。一方、野菜などの植物に含まれる鉄は非ヘム鉄であり、非ヘム鉄の吸収率はヘム鉄の吸収率の1/2から1/5程度である。さらに非ヘム鉄は食物繊維や緑茶に含まれるカテキン等によって吸収が阻害され易い。従って、植物から充分量の鉄を摂ることは現実的でない。

【0003】

従来、鉄の補給により貧血を予防又は治療するために、ピロリン酸鉄、クエン酸鉄、硫酸鉄等の各種鉄剤が用いられている。しかし、これらの鉄剤に含まれる鉄は一般に生体内で利用率が低いため、貧血の予防又は治療効果を得るために、多量を摂取する必要がある。しかし、これらの鉄塩は多量の摂取により胃腸粘膜障害又は嘔吐などを引き起こす恐れがあるため、短期間に多量を摂取することは難しい。従って、貧血予防又は治療効果を得るために、これらの鉄塩を長期間に亘り摂取する必要がある。

従来使用されているその他の鉄補給剤としては、乳汁に含まれるラクトフェリンが挙げられる。ラクトフェリンは鉄結合能を持つ糖タンパクであることが知られている。特許文献1は、鉄-ラクトフェリン複合体の増血効果及びその製造方法を開示している。しかし、鉄-ラクトフェリン複合体は、溶解性が悪く、また鉄の所要量に対し多量のラクトフェリンを摂取する必要があることから、鉄剤としては実用化されていない。

また非特許文献1は、EDTA-FeNaを有効成分とする鉄強化剤の吸収の検討結果を開示している。しかし、EDTAは生体内の多くの微量元素に対し強いキレート化作用を有するため、生体内の必要金属をキレート化により不活性化する可能性があることから、EDTA-FeNaを有効成分とする鉄強化剤の実用化は難しい。

一方、清酒の醸造においては、カビの一種である麹菌（アルベルギルス・オリゼ；*Aspergillus oryzae*）を蒸米上に生育させて「麹」を作製し、清酒醸造の副原料として利用している。この麹造りにおいて、麹菌が大量のフェリクローム類、主にデフェリフェリクリシンを生産し、このフェリクローム類が酒造用水由來の鉄イオンをキレート化することにより清酒が着色することが古くから知られている。このように、麹菌は多量のフェリクローム類を生産することが知られているが、清酒醸造においてはフェリクローム類は清酒の品質劣化の原因であることから、その有効利用は全く考えられていない。

【特許文献1】日本国特許第2884045号

【非特許文献1】「微量栄養素研究」、第18集、第25～28頁（2001）

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、生体内への鉄の吸収率が高い鉄補給剤及び鉄補給用組成物を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】**【0005】**

上記課題を解決するために本発明者は研究を重ね、以下の知見を得た。

(1) 鉄欠乏による貧血は、肝臓の貯蔵鉄が欠乏する第1段階、血清中の鉄が欠乏する第2段階、及び、ヘモグロビン合成能が低下して貧血症状が現れる第3段階を経て進行する。また鉄欠乏性貧血はこの逆の段階を経て快復する。

【0006】

シデロフォアの3価鉄キレート錯体は、鉄欠乏性貧血ラットに摂取させた場合、生体内に効率的に吸収されて血清中の鉄濃度及び血中ヘモグロビン濃度を増加させ、さらに肝臓の貯蔵鉄も増加させる。従って、シデロフォアの3価鉄キレート錯体は、鉄欠乏による各種症状、特に鉄欠乏性貧血の予防、改善又は治療剤として有用である。

(2) シデロフォアの3価鉄キレート錯体は、ラットに摂取させた場合、体重増加量、摂食量、肝機能及び腎機能に悪影響を与えないため、安全な鉄補給剤である。

(3) シデロフォアの3価鉄キレート錯体は、水に対する溶解性が高く、一般に鉄化合物が沈殿を生じ易い酸性条件下でも高い水溶性を示すため、液状食品への添加剤として使用し易い。

(5) シデロフォアの3価鉄キレート錯体は、広いpH範囲の下での加熱加圧に対して極めて安定であり、変性しない。従って、医薬組成物又は食品組成物の成分として使用する場合に、これらの組成物を加熱加圧滅菌できる。

【0007】

本発明は上記知見に基づき完成されたものであり、以下の鉄補給剤などを提供する。

【0008】

項1. シデロフォアと3価鉄イオンとを含む鉄補給剤。

【0009】

項2. シデロフォアと3価鉄イオンとがキレート錯体の形態で含まれている項1に記載の鉄補給剤。

【0010】

項3. シデロフォアがヒドロキサム酸を含むものである項1又は2に記載の鉄補給剤

。

【0011】

項4. シデロフォアの3価鉄キレート錯体がフェリクローム類である項3に記載の鉄補給剤。

【0012】

項5. フェリクローム類がフェリクリシンである項4に記載の鉄補給剤。

【0013】

項6. シデロフォアと3価鉄イオンとを含む鉄欠乏性貧血の予防、改善又は治療剤。

【0014】

項7. シデロフォアと3価鉄イオンとがキレート錯体の形態で含まれている項6に記載の鉄欠乏性貧血の予防、改善又は治療剤。

【0015】

項8. シデロフォアがヒドロキサム酸を含むものである項6又は7に記載の鉄欠乏性貧血の予防、改善又は治療剤。

【0016】

項9. シデロフォアの3価鉄キレート錯体がフェリクローム類である項8に記載の鉄欠乏性貧血の予防、改善又は治療剤。

【0017】

項10. フェリクローム類がフェリクリシンである項9に記載の鉄欠乏性貧血の予防

、改善又は治療剤。

【0018】

項11. シデロフォアと3価鉄イオンとを含む食品添加剤。

【0019】

項12. シデロフォアと3価鉄イオンとがキレート錯体の形態で含まれている項11に記載の食品添加剤。

【0020】

項13. シデロフォアがヒドロキサム酸を含むものである項11又は12に記載の鉄補給剤。

【0021】

項14. シデロフォアの3価鉄キレート錯体がフェリクローム類である項13に記載の鉄補給剤。

【0022】

項15. フェリクローム類がフェリクリシンである項14に記載の鉄補給剤。

【0023】

項16. 項1～5のいずれかに記載の鉄補給剤を含む食品組成物。

【0024】

項17. 項1～5のいずれかに記載の鉄補給剤を含む医薬組成物。

【0025】

項18. 項1～5のいずれかに記載の鉄補給剤を含む鉄欠乏性貧血の予防、改善又は治療用組成物。

【0026】

項19. シデロフォアと3価鉄イオンとを有効成分として含む鉄補給剤。

【0027】

項20. シデロフォアと3価鉄イオンとを有効成分として含む鉄欠乏性貧血の予防、治療又は改善剤。

【0028】

項21. シデロフォアと3価鉄イオンとを有効成分として含む食品添加剤。

【0029】

以下、本発明を詳細に説明する。

(I)鉄補給剤

基本的構成

本発明の鉄補給剤は、シデロフォアと3価鉄イオンとを含み、特にこれらを有効成分として含む。シデロフォアと3価鉄イオンとは別々に含まれていてもよく、又は、キレート錯体の形態で含まれていてもよい。

シデロフォア

本発明において、「シデロフォア」は、3価鉄イオンをキレート化できる化合物を指す。

【0030】

シデロフォアの由来は特に限定されず、どのような生物に由来するものであってもよい。多くの微生物は、外界の鉄濃度が低いときに必須成分である鉄を効率的に取り込むためにシデロフォアを生産する。微生物は容易に増殖させることができるために、微生物を用いることによりシデロフォアを容易に大量生産することができる。この点で微生物に由来するシデロフォアが好ましい。さらに、シデロフォア合成酵素群をコードする遺伝子の組換えによりシデロフォアを多量に生産する宿主を容易に作製できる点でも、微生物に由来するシデロフォアが好ましい。

【0031】

微生物由来のシデロフォアの種類は特に限定されない。例えば、シデロフォアと3価鉄イオンとのキレート錯体として、エンテロバクチン、ビブリオバクチン、アグロバクチン、アンゲイバクチンのようなカテコール類；コプロゲン、フェリクローム類、フェリオキ

サミン、N, N', N''-トリアセチルフザリニンCのようなヒドロキサメート類；及びリゾフェリンのようなポリカルボキシレート類などが挙げられる。

【0032】

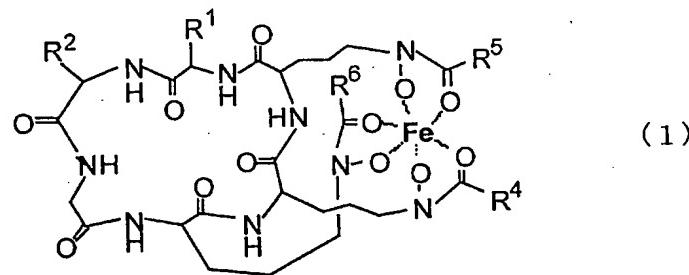
特に、鉄キレート力の点で、ヒドロキシメート類（ヒドロキサム酸を含むシデロフォア）が好ましい。その中でも安定性の点で、環状であるフェリクローム類がより好ましい。

【0033】

フェリクローム類は、3個のヒドロキサム酸を含む環状ペプチド化合物の総称であり、下記一般式(1)で表される化合物を含む。

【0034】

【化1】



(式中、R¹は水素原子、又はヒドロキシメチル基を示し；R²は水素原子、メチル基又はヒドロキシメチル基を示し；R³、R⁴、R⁵は、同一又は異なって、メチル基、N⁵-（トランス-5-ヒドロキシ-3-メチルペント-2-エノイル）基、N⁵-（シス-5-ヒドロキシ-3-メチルペント-2-エノイル）基、又はN⁵-（トランス-4-カルボキシ-3-メチルペント-2-エノイル）基を示す。)

一般式(1)の化合物の中では、フェリクローム、ジグリシルフェリクローム、フェリクリシン、フェリクロームC、フェリクロシン、アスペルクロームD1、アスペルクロームB1、フェリブリン、フェリロジン、フェリクロームA、デス（ジセリルグリシル）フェリロジン（フェリロジンにおいて-Ser-Ser-Gly-を除いた化合物）が好ましく、フェリクリシンが最も好ましい。

【0035】

これらの化合物の一般式(1)における官能基であるR¹～R⁵を以下の表1にまとめて示す。

【0036】

【表 1】

	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
フェリクローム (Gly) ₄ フェリクローム*	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
フェリクローム C	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
フェリクロシン	H	CH ₂ OH	CH ₃	CH ₃	CH ₃
フェリクリシン	CH ₂ OH	CH ₂ OH	CH ₃	CH ₃	CH ₃
アスペルクロム D1	CH ₂ OH	CH ₂ OH	A	CH ₃	CH ₃
アスペルクロム B1	CH ₂ OH	CH ₂ OH	CH ₃	A	A
フェリロビン	CH ₂ OH	CH ₂ OH	A	A	A
フェリロディン	CH ₂ OH	CH ₂ OH	B	B	B
フェリクローム A	CH ₂ OH	CH ₂ OH	C	C	C
DDF**	—	—	B	B	B

* : フェリクロームの中の gly 3分子が4分子になったもの
** : デス (ジセリルグリシル) フエリロジン, フエリロディンから Ser-Ser-Gly の 3分子が次如したもの

A: N⁶- (トランス-5-ヒドロキシ-3-メチルペント-2-エノイル) 基
B: N⁶- (トランス-5-ヒドロキシ-3-メチルペント-2-エノイル) 基
C: N⁶- (トランス-4-カルボキシ-3-メチルペント-2-エノイル)

これらのフェリクローム類は、アスペルギルス属、ニューロスボラ (Neurospora) 属、ウスティラゴ(Ustilago)属などの真菌により生産される。アスペルギルス属糸状菌であるアスペルギルス・オリゼは、清酒、味噌、醤油などの生産において使用されてきたため、ヒトは古くからフェリクローム類を摂取してきた。従って、フェリクロームは、その安全性が歴史的に確認されている点で好ましい。麹菌が生産するフェリクローム類の中でもフェリクリシンは、アスペルギルス・オリゼが比較的多量に生産するため、生産性がよい点で好ましい。

【0037】

本発明において、シデロフォアは、天然型シデロフォアの他、第二鉄のキレート化作用を有する天然型シデロフォアの誘導体も使用できる。天然型シデロフォアの誘導体として

は、アセチル化、ニトロ化したものや、アミノ酸の一部が置換されたもの等が挙げられる。

【0038】

シデロフォアは、生物から回収することにより製造できる。生物を鉄制限下で生育させると、鉄を含まないデフェリ体（シデロフォア）が生成される。このデフェリ体に鉄を加えることにより通常3価鉄イオンをキレート化した錯体となる。生物から回収されたシデロフォアは粗標品のままであってもよく、精製されたものであってもよい。

【0039】

シデロフォアの精製は、公知の精製方法、例えばイオン交換、疎水、ゲルろ過、アフィニティのような各種クロマトグラフィー等により行えばよい。例えば、糸状菌からシデロフォアを回収する場合は、液体培養して上清中に生産されたものを回収してもよく、固体培養して固体培養物から水又は緩衝液を用いて抽出した抽出液から回収してもよい。いずれにしても本発明の鉄補給剤には、例えば生物由来の夾雑物が含まれる場合がある。

【0040】

またシデロフォアは、市販品を購入することもできる。また、これらのシデロフォアの混合物であってもよい。

フェリクリシン

フェリクリシンを構成する配位子であるデフェリフェリクリシンは、麹造り（固体培養）においてアスペルギルス・オリゼが多量に生産することが知られているフェリクローム類の1種である。アスペルギルス・オリゼが生産するフェリクローム類の殆どがデフェリフェリクリシンである。デフェリフェリクリシンは3価鉄イオンをキレート化してフェリクリシンになる。

【0041】

デフェリフェリクリシンは、例えば以下の方法でアスペルギルス・オリゼから回収することができる。即ち、アスペルギルス・オリゼを培養する培地として、例えばポテトデキストロース培地（ニッスイ社）または最少培地（2%グルコース（又は starch）、0.3% NaNO₃、0.2% KC1、0.1% KH₂PO₄、0.05% MgSO₄、pH 6.0）等を使用できる。培地は、固体培地でも液体培地でもよいが、デフェリフェリクリシンを回収し易い点で、液体培地を使用することが好ましい。また、米麹のような固体培地も、そこからデフェリフェリクリシンを回収、精製することなく、そのまま食品組成物に使用できる点で好ましい。

【0042】

培養温度は、アスペルギルス・オリゼの生育可能温度範囲であればよく、例えば25~42℃程度が挙げられる。培養時間は、その他の条件によって異なるが、通常2~7日間程度とすればよい。

【0043】

培養終了後、菌体をろ過後、培養液からフェリクリシンを回収する。さらに、この培養上清を、公知のタンパク質精製方法、例えばイオン交換、疎水、ゲルろ過、アフィニティなどの各種クロマトグラフィーに供することにより精製デフェリフェリクリシンが得られる。

3価鉄イオン

シデロフォア（デフェリ体）と3価鉄イオンとが混合されることにより、通常、速やかにキレート錯体が生成する。本発明の鉄補給剤が投与されると、3価鉄イオンは、シデロフォアとのキレート錯体の形態で、血中ヘモグロビン濃度、血清鉄濃度及び肝臓中鉄濃度を効果的に向上させる。

【0044】

鉄補給剤中に含まれるシデロフォアと3価鉄イオンとの混合比率は、通常1~5:1程度が好ましく、1~2:1程度がより好ましい。シデロフォアと3価鉄イオンとは同モル程度含まれることが通常最も好ましい。

【0045】

但し、本発明の鉄補給剤が後述する食品組成物に含まれるときであって、食品に鉄が含まれる場合は、鉄補給剤中の3価鉄イオンのモル数をシデロフォアのモル数より少なくして、食品組成物中にキレート化されていない3価鉄イオンが含まれないようにするが好ましい。

製造方法

本発明の鉄補給剤は、シデロフォアと3価鉄イオンとを混合すること、又は、組み合わせることにより製造できる。

【0046】

(II) 鉄補給用組成物

医薬組成物

本発明の医薬組成物は、上述した本発明の鉄補給剤を含む組成物である。特に本発明の医薬組成物は、シデロフォア及び3価鉄イオンを有効成分として含む。本発明の医薬組成物は、薬学的に許容される各種担体(賦形剤、結合剤、崩壊剤、潤沢剤等が含まれる)と配合し、製剤とされる。また本発明の医薬組成物は、慣用の添加剤を含んでいてよい。

【0047】

賦形剤としては、公知のものを広く使用でき、例えば、乳糖、ショ糖、ブドウ糖等の各種の糖類、パレイショデンプン、コムギデンプン、トウモロコシデンプン等の各種デンプン類、結晶セルロース等の各種セルロース類、無水リン酸水素カルシウム、炭酸カルシウム等の各種無機塩類等が挙げられる。

【0048】

結合剤としては、公知のものを広く使用でき、例えば、結晶セルロース、プルラン、アラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、マクロゴール等が挙げられる。

【0049】

崩壊剤としては、公知のものを広く使用でき、例えば、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルスター、デンプン、アルギン酸ナトリウム等が挙げられる。

【0050】

潤沢剤としては、ステアリン酸マグネシウムなどが挙げられる。

【0051】

製剤形態は、特に限定されず、例えば錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤等の経口投与剤；注射剤、点滴剤、外用剤、座剤等の非経口投与剤等などの各種製剤形態を挙げることができる。

【0052】

本発明の医薬組成物は、製剤形態に応じて経口投与又は非経口投与することができる。

【0053】

医薬組成物中のシデロフォア及び3価鉄イオンの含有量は、シデロフォアの種類、投与経路、投与対象又は患者の年齢、体重、症状等によって異なり一概に規定できないが、鉄キレート錯体の形態での1日投与量が通常20～170mg程度、より好ましくは40～80mg程度になる量とすればよい。1日1回投与する場合は、1製剤中にこの量が含まれていればよく、1日3回投与する場合は、1製剤中にこの3分の1量が含まれていればよい。

【0054】

シデロフォアは高温(例えば120℃程度)高圧(例えば200kPa程度)処理によっても変性しない又は変性し難いことから、医薬組成物の成分として用いる場合に、加熱加圧滅菌できるという利点を有する。またシデロフォアは、従来麹を用いた食品に含まれていることから、その安全性が歴史的に確認されており、医薬組成物の成分として使用する場合に副作用が生じない又は適性用量では副作用が生じない。

食品組成物

上述した本発明の鉄補給剤は、食品に添加して食品組成物として使用できる。即ち、本

発明の鉄補給剤は食品添加剤として使用できる。

【0055】

また本発明の食品組成物は、シデロフォア及び3価鉄イオンを含むものであり、特にこれらを有効成分として含む。シデロフォアの3価鉄錯体は従来清酒に含まれている成分であり、食品の風味を損ねるような味や匂いを有さない。従って、食品の種類は特に限定されない。例えば、クッキー、飴、ガム、チョコレート、ゼリーのような菓子；ジュース、茶、スープ、甘酒のような飲料；ハム、ソーセージ、蒲鉾、竹輪のような練り物；ソース、ケチャップ、ドレッシング、マヨネーズ、醤油、味噌、酒粕のような調味料；ぶりかけ、漬物、佃煮、塩昆布のような常備惣菜類；惣菜；麺、米飯、粥のような主食類などが挙げられる。

【0056】

シデロフォアは、高い水溶性を有しているため液状食品への添加剤として使用できるという利点がある。また、一般に鉄化合物の水溶性が低くなる低pH条件下でも高い水溶性を示すため、マヨネーズやドレッシングのような液状酸性食品の添加剤としても好適に使用できるという利点がある。また前述したように高温高圧処理に耐えるため、本発明の鉄補給剤を添加した食品の加熱加圧滅菌を行えるとともに、レトルト処理のような特殊な製造工程を経ることもできる。さらにシデロフォアは、従来麹を用いた食品に含まれていることから、その安全性が歴史的に確認されている点でも、食品添加物として好適である。

【0057】

食品組成物中のシデロフォア及び3価鉄イオンの含有量は、シデロフォアの種類、投与対象又は患者の年齢、体重、症状等によって異なり一概に規定できないが、キレート錯体の形態での1日摂取量が、20～170mg程度、特に40～80mg程度になる量とすればよい。

【0058】

また、食品中のシデロフォア及び3価鉄イオンの濃度は、食品の種類などによって異なるが、固体状食品の場合及び液体状食品の場合のいずれも、キレート錯体の形態で通常0.1～5mg/g程度、特に0.5～2mg/g程度であることが好ましい。食品の形態によって異なるが、一般的な固形状食品の1回の摂取量は10g～50g程度であり、上記の摂取量で1日に必要な鉄イオンを補給することができる。上記範囲であれば、十分な鉄補給効果が得られるとともに、鉄過剰症になったり、食品が着色したりする懼れがない。

【0059】

本発明の食品組成物には、食品組成物の調製に当たり慣用されている各種添加剤を添加配合することができる。添加剤としては、例えば、安定化剤、pH調整剤、糖類、甘味料、香料、各種ビタミン類、ミネラル類、抗酸化剤、賦形剤、可溶化剤、結合剤、滑沢剤、懸濁剤、湿潤剤、皮膜形成物質、矯味剤、矯臭剤、着色料、保存剤等を例示することができる。

(III) 鉄補給剤及び鉄補給用組成物の使用方法

本発明の鉄補給剤、鉄補給用医薬組成物及び鉄補給用食品組成物は、生体内への鉄の吸収率が高いため、鉄の欠乏による、貧血、運動・学習能力低下、免疫力低下等の予防、改善又は治療のために好適に使用できる。特に、鉄欠乏性貧血の予防、改善又は治療のために好適に使用できる。

【0060】

鉄補給剤は、そのまま摂取することができ、又は、食品添加剤若しくは医薬組成物の成分として使用することもできる。

【0061】

鉄補給剤及び鉄補給用組成物の投与対象は、鉄欠乏による症状が現れているヒト又は健常人のいずれであってもよい。

【0062】

投与量は、シデロフォアの種類、投与対象の症状、年齢、体重などによって異なるが、キレート錯体の形態での1日投与量が20～170mg程度、特に40～80mg程度となる

量を1日1回又は数回に分けて投与すればよい。

【発明の効果】

【0063】

本発明によれば、生体内への鉄の吸収率が高い鉄補給剤及び鉄補給用組成物が提供された。

【0064】

詳述すれば、従来2価鉄イオンの方が生体内への吸収率が高いといわれているが、シデロフォアの3価鉄キレート錯体は、生体内に効率的に吸収されて、血清中の鉄濃度を増加させる。従って、鉄補給剤として好適に使用できる。さらにシデロフォアの3価鉄キレート錯体は、血中のヘモグロビン濃度及び肝臓中鉄濃度を増加させる。従って、特に、鉄欠乏性貧血の予防、改善又は治療用の鉄補給剤として有用である。

【0065】

またこの鉄キレート錯体は、清酒や酒粕のような麹を用いた食品に元来含まれていることから、その安全性は歴史的に証明されている。また後述するように、肝機能・腎機能、体重増加量、摂食量などを低下させず、生体に悪影響を及ぼさないことが判明した。従つて、鉄欠乏による各種症状の改善又は治療のためのみならず、予防のために継続的に使用することもできる。同様に、健常人が摂取する機能性食品としても好適である。

【0066】

また、シデロフォアの3価鉄キレート錯体は、麹を用いた食品に元来含まれていることからも分かるように、強い味や臭いを有さないため、医薬品や食品の成分、特に食品添加物として使用し易い。

また、水に溶解し易いため、シロップ剤のような剤型に成型し易く、また液状食品の添加物として使用し易い。また低pHの溶液にも溶解し易いため、ドレッシングのような酸性液状食品にも添加できる。特に、多くの鉄化合物がpH=4以下の溶液中で沈殿を生じ易いが、シデロフォアはこのような酸性溶液中でも高い水溶性を示すことが特長の一つである。

【0067】

また、高温高圧処理に対して耐性を示し、高温高圧滅菌によっても変性しない又は変性し難いため、医薬品又は食品の成分として使用する場合に、加熱加圧滅菌できる。特に加圧処理に耐性を示すことから、殺菌条件の厳しいレトルト食品への添加剤としても利用できる。さらに、広いpH範囲で熱及び圧力に耐性を示すことから、医薬又は食品に添加する場合に、医薬又は食品の製造工程を制限せず、多様な製造工程が可能になる。

【0068】

さらに、一般に配位子と金属イオンとが別個に存在するより錯体を形成する方が低エネルギー状態、即ち化学的に安定な状態になる。このことから、シデロフォアには鉄イオンが示す過酸化物生成反応の促進作用が見られない。(Metal. Lons Biol. Syst., Vol35 p 37) このように、生体に有害な過酸化物生成を促進しない点でも、シデロフォアは食品や医薬品として利用価値が高い。

【発明を実施するための最良の形態】

【0069】

以下、本発明を実施例及び試験例を示してより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されない。

フェリクリシンの調製

米麹を水で抽出した抽出液(デフェリフェリクリシン含有)に、デフェリフェリクリシンと等モルの塩化第二鉄を加えてフェリクリシン溶液を作製した後、限外濾過膜を用いて分子量5000以上のタンパク質などの高分子を除去し、ろ液をカラムクロマトにより濃縮した。フェリクリシンは430nmに極大吸収を示す性質が知られている(Agr. Biol. Chem., Vol. 31, No12, p1482)ため、上記の手法で調製された溶液をHPLC分析し、430nmの吸収を示す物質の大半がフェリクリシンであることを確認した。

【0070】

出証特2005-3019939

ラットに与えた飼料の鉄濃度はフェリクリシン、水溶性ヘム鉄、クエン酸第二鉄すべてHPLCでなく原子吸光により35ppmに調製した。フェリクリシンのHPLC分析は、430nmに吸収を示す物質がほとんどフェリクリシンであったことを示す定性分析である。

【実施例1】

【0071】

4週齢のSD系雄ラット15匹に、鉄欠乏飼料を35日間自由摂取させて、血液中の平均ヘモグロビン値が6.5mg/dlまで低下した鉄欠乏性貧血ラットを作製した。また、対照群の4週齢のSD系雄ラット5匹には鉄含有飼料1を与えた。対照群に与えた鉄含有飼料1の鉄源は通常ラットの飼育飼料に使用されているクエン酸第二鉄であり、その鉄含量はラットの生育に最適とされている35ppmである。

【0072】

【表2】

含有成分	鉄欠乏飼料(%)	鉄含有飼料1(%)
コーンスターク	33	33
カゼイン	22	22
セルロースパウダ	5	5
シュークロース	30	30
コーンオイル	5	5
混合塩類1	4	0
混合塩類2	0	4
混合ビタミン	1	1
鉄含量	1ppm	35ppm

上記の表2における混合塩類1及び混合塩類2は、ハーバーミネラル混合に準じて調製したものであり、以下の表3に組成を示す混合物である。

【0073】

【表3】

含有成分	混合塩類1	混合塩類2
	(100g中含量(g))	(100g中含量(g))
CaHPO ₄ · 2H ₂ O	0.43	0.43
KH ₂ PO ₄	34.31	34.31
NaCl	25.06	25.06
Fe-citrate (Fe17%)	0	0.45
MgSO ₄	4.876	4.876
ZnCl ₂	0.02	0.02
MnSO ₄ · 4~5H ₂ O	0.121	0.121
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.156	0.156
KI	0.0005	0.0005
CaCO ₃	29.29	29.29
(NH ₄) ₆ MoO ₂₄ · 4H ₂ O	0.0025	0.0025

いずれも、セルロースパウダーで100gに調整する

また表2における混合ビタミンは、AIN-76ビタミン(コリン添加)に準じて調製したものであり、下記の表4の組成を有する混合物である。

【0074】

【表4】

含有成分	100g 中含量	
ビタミンA・アセテート	40,000	IU
ビタミンD ₃	10,000	IU
ビタミンE・アセテート	500	mg
ビタミンK ₃	0.5	mg
ビタミンB ₁ ・塩酸塩	60	mg
ビタミンB ₂	60	mg
ビタミンB ₆ ・塩酸塩	70	mg
ビタミンB ₁₂	0.1	mg
D-ピオチン	2	mg
葉酸	20	mg
パントテン酸カルシウム	160	mg
ニコチニン酸	300	mg
重酒石酸コリン	20	g

セルロースパウダーで100gに調整する

次いで、15匹の鉄欠乏性貧血のラットを3群に分け、それぞれ、以下の鉄含有飼料1、2及び3を3週間自由摂食させた。鉄含有飼料1は鉄源としてクエン酸第二鉄を含み、鉄含有飼料2は鉄源として水溶性ヘム鉄を含み、鉄含有飼料3は鉄源としてフェリクリシンを含む。鉄含有飼料1、2及び3の組成を以下の表5に示す。なお、鉄含有飼料1は表2に示したものと同じである。

【0075】

【表5】

含有成分	鉄含有飼料1 (%)	鉄含有飼料2 (%)	鉄含有飼料3 (%)
コーンスターチ	33	33	33
カゼイン	22	22	22
セルロースパウダー	5	5	5
シュークロース	30	30	30
コーンオイル	5	5	5
混合塩類2	4	0	0
混合塩類3	0	4	0
混合塩類4	0	0	4
混合ビタミン	1	1	1
鉄含量	35ppm	35ppm	35ppm

表5における混合塩類2、3及び4は以下の表6に組成を示す混合物である。また表5における混合ビタミンは上記表4に組成を示す混合物である。

【0076】

【表6】

含有成分	混合塩類 2	混合塩類 3	混合塩類 4
	(100g 中含量(g))	(100g 中含量(g))	(100g 中含量(g))
CaHPO ₄ · 2H ₂ O	0.43	0.43	0.43
KH ₂ PO ₄	34.31	34.31	34.31
NaCl	25.06	25.06	25.06
Fe-citrate (Fe 17%)	0.45	0	0
Heme (Fe 1%)	0	10.1	0
Ferrichrysin(Fe 1%)	0	0	11.5
MgSO ₄	4.876	4.876	4.876
ZnCl ₂	0.02	0.02	0.02
MnSO ₄ · 4~5H ₂ O	0.121	0.121	0.121
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.156	0.156	0.156
KI	0.0005	0.0005	0.0005
CaCO ₃	29.29	29.29	29.29
(NH ₄) ₆ MoO ₂₄ · 4H ₂ O	0.0025	0.0025	0.0025

セルロースパウダーで 100g に調整する

血中ヘモグロビン濃度の測定

鉄欠乏性貧血にした後に、それぞれ鉄含有飼料1（クエン酸第二鉄）、鉄含有飼料2（ヘム鉄）及び鉄含有飼料3（フェリクリシン）を投与した各群のラットについて、飼料の投与前に一部採血を、投与3週間後に全採血をそれぞれ行い、常法により血液中のヘモグロビン濃度を測定した。また、当初から鉄含有飼料1（クエン酸第二鉄）を投与した対照群ラットについては、鉄含有飼料1を投与した。結果を以下の表7に示す。表7中の値は、各群5匹のヘモグロビン濃度の平均値±標準偏差値を示す。

【0077】

【表7】

	鉄含有飼料投与前 (mg/dl)	鉄含有飼料投与後 (mg/dl)
クエン酸第二鉄摂取群	5.7±0.7	13.3±2.3
水溶性ヘム鉄摂取群	6.1±1.0	8.0±0.9
フェリクリシン摂取群	6.4±0.9	14.3±0.3
対照群	14.6±0.6	14.2±0.1

表7から明らかなように、鉄源としてクエン酸第二鉄又はフェリクリシンを含む試料を摂食した群では、対照群と同じレベルにまでヘモグロビン値が増加した。これに対して、水溶性ヘム鉄を摂取した群では血中ヘモグロビン濃度の回復は認められず、鉄含有飼料摂取後には、ヘム鉄摂取群とフェリクリシン摂取群の間には危険率5%の水準で有意差が認められた。このように、鉄欠乏性貧血症の第3ステップであるヘモグロビン合成能の低下に対して、フェリクリシンを摂取した群ではクエン酸第二鉄と同等の改善効果が認められ、またヘム鉄に較べて有意に優れた改善効果が認められた。

血清中鉄濃度の測定

また、鉄含有飼料投与後に各群ラットから全採血した血液より血清を調整し、常法に従い血清鉄濃度を測定した。結果を以下の表8に示す。表8中の値は、各群5匹の血清鉄濃度の平均値±標準偏差値である。

【0078】

【表8】

鉄含有飼料投与後 ($\mu\text{g/dl}$)	
クエン酸第二鉄摂取群	131.5±25.7
水溶性ヘム鉄摂取群	50.4±6.6
フェリクリシン摂取群	116.7±24.1
対照群	106.2±4.7

表8から明らかなように、鉄源としてクエン酸第二鉄またはフェリクリシンを含む飼料を摂取した群では、対照群と同じレベルにまで血清鉄濃度が増加した。これに対して、水溶性ヘム鉄を摂取した群では著しく血清鉄が減少しており対照群と比較して危険率1%の水準で有意差が認められた。このように、鉄欠乏性貧血症の第2ステップである循環鉄濃度の低下に対して、フェリクリシンを摂取した群ではクエン酸第二鉄と同等の改善効果が認められ、またヘム鉄に較べて対有意に優れた改善効果が認められた。

肝臓中鉄濃度の測定

鉄欠乏性貧血にした後に、それぞれ鉄含有飼料1（クエン酸第二鉄）、鉄含有飼料2（ヘム鉄）及び鉄含有飼料3（フェリクリシン）を投与した群のラット、及び、当初から鉄含有飼料1（クエン酸第二鉄）を摂食させた対照群ラットについて、鉄含有飼料の3週間の摂食終了後時に肝臓を脱血灌流して摘出し、重量を測定した後、凍結乾燥を行った。また、乾燥肝臓を灰化し原子吸光に供して鉄濃度を測定した。さらに、肝臓の水分含量を計算し、乾燥肝臓における鉄濃度と肝臓の水分含量とから生体内の肝臓に貯蔵されている鉄濃度を求めた。結果を以下の表9に示す。表9中の値は、各群5匹のラットについての肝臓鉄濃度の平均値±標準偏差である。

【0079】

【表9】

肝臓鉄濃度(ppm)	
クエン酸第二鉄摂取群	21.6±3.1
水溶性ヘム鉄摂取群	6.2±1.3
フェリクリシン摂取群	39.3±7.6
対照群	63.3±10.1

表9から明らかなように、鉄欠乏飼料を摂食させた群では重度の鉄欠乏性貧血を発症させたため、どの鉄摂取群も対照群と比較して肝臓に貯蔵されている鉄量は減少していた。しかし、各群間に危険率1%の有意差が認められ、鉄源の違いによる貯蔵鉄改善効果の優劣が明らかとなった。即ち、貧血症の第3ステップである貯蔵鉄濃度の低下に対して、フェリクリシンを摂取した群はクエン酸第二鉄摂取群および水溶性ヘム鉄摂取群と比較して有意に優れた改善効果が認められた。

肝臓機能・腎臓機能に与える影響の検討

鉄欠乏性貧血にした後に、それぞれ鉄含有飼料1（クエン酸第二鉄）、鉄含有飼料2（ヘム鉄）及び鉄含有飼料3（フェリクリシン）を投与した各群のラット、及び、当初から鉄含有飼料1（クエン酸第二鉄）を摂食させた対照群ラットについて、常法に従い血清中のタンパク質濃度、ALT（アラニンアミノトランスフェラーゼ）濃度、AST（アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ）濃度、クレアチニン濃度を測定した。結果を以下の表10に示す。表10中の値は、各群5匹のラットについての平均値±標準偏差である。aを付した数値とbを付した数値との間には有意差があることを示す。

【0080】

【表10】

	血清タンパク質 (mg/ml)	ALT(Karmen) 22.0±3.5	AST(Karmen) 96.0±14.0	クレアチニン (mg/dl) 0.57±0.00
クエン酸第二鉄摂取群	69.5±3.9	22.0±3.5	96.0±14.0	0.57±0.00
水溶性ヘム鉄摂取群	67.0±1.8	23.7±3.2	90.3±8.5 ^a	0.75±0.11
フェリクリシン摂取群	67.6±4.1	17.7±2.3 ^a	72.3±3.2	0.63±0.06
対照群	72.8±5.8	29.3±4.2 ^b	69.0±5.2 ^b	0.71±0.09

表10から明らかなように、いずれの群においても、血清分析値は正常範囲内にあり、肝機能および腎機能の異常を示唆する結果は認められなかった。このことから、鉄源の違いによる臓器機能への影響はなかったものと考えられる。鉄源としてフェリクリシンを摂取した群は全ての検査項目において良好な値を示し、フェリクリシンを摂取することで生体に有害な副作用が生じないことが明らかとなった。

体重増加量・摂食量に及ぼす影響の検討

鉄欠乏性貧血にした後に、それぞれ鉄含有飼料1（クエン酸第二鉄）、鉄含有飼料2（ヘム鉄）及び鉄含有飼料3（フェリクリシン）を投与した各群のラット、及び、当初から鉄含有飼料1（クエン酸第二鉄）を摂食させた対照群ラットについて、1匹あたりの体重増加量および摂餌量を以下の表11に示す。体重増加量は各群5匹の平均値±標準偏差である。

【0081】

【表11】

	体重増加量 (g/3週間)	平均摂餌量 (g/3週間)
クエン酸第二鉄摂取群	79.8±9.2	384.8
水溶性ヘム鉄摂取群	55.3±14.9	328.3
フェリクリシン摂取群	70.1±8.3	366.3
対照群	65.3±19.2	336.2

表11から明らかなように、水溶性ヘム鉄を摂取した群は体重増加量が低下したが、対照群に対して有意差は認められなかった。水溶性ヘム鉄摂取群では、貧血による体重増加量の抑制および摂餌量の減少が発生したと考えられる。一方、クエン酸第二鉄摂取群およびフェリクリシン摂取群では、対照群よりも体重増加量および摂餌量が増大していた。このことから、フェリクリシン摂取により、体重増加の抑制および摂食障害などの生体の生育に及ぼす有害な副作用は発生しないと考えられる。

【実施例2】

【0082】

フェリクリシンの水への溶解性の検討

フェリクリシンの溶解性を他の鉄化合物と比較した。鉄化合物としては実施例1で用いた水溶性ヘム鉄、クエン酸第二鉄及びフェリクリシンを用いた。これらの鉄化合物の各0.1gをそれぞれpH=2およびpH=7の緩衝液1mlに溶解し、37℃で90分間保温した。pH=2の緩衝液としてはグリシン-塩酸緩衝液を使用し、pH=7の緩衝液としてはリン酸緩衝液を使用した。各緩衝液中の緩衝剤の濃度は0.1モル/Lとした。各緩衝液を保温後、遠心分離し、沈殿の有無を目視で確認した。また、上清の鉄濃度を原子吸光法により測定した。結果を以下の表12に示す。

【0083】

【表12】

		鉄濃度 (ppm)	沈殿の有無
水溶性ヘム鉄	pH2.0	N.D.	あり
	pH7.0	468	なし
クエン酸第二鉄	pH2.0	600	あり
	pH7.0	400	あり
フェリクリシン	pH2.0	3800	なし
	pH7.0	3750	なし

表12から明らかなように、フェリクリシンは極めて水溶性が高かった。多くの鉄化合物が酸性条件下で沈殿を生じることが知られている。また上記の結果から明らかなように、塩化第二鉄及びヘム鉄も酸性条件下で沈殿を生じている。これに対して、フェリクリシンは、酸性条件下でも高い水溶性を示した。フェリクリシンの鉄は3価であるが、錯体となることにより高い水溶性を獲得したと考えられる。これにより、生体内で利用しやすい性質となった。

【実施例3】

【0084】

フェリクリシンの熱安定性・pH安定性の検討

フェリクリシンは430nmに吸収極大を示すことが知られている。この特徴を利用してフェリクリシンのpHおよび熱安定性を試験した。

上述したようにして米麹抽出液から調製したフェリクリシンを2.5mg/mlとなるように超純水に溶解した。さらに以下の各緩衝液を用いてフェリクリシン濃度が0.25mg/mlとなるように希釈した。pH=2及び3の各緩衝液としてはグリシン-塩酸緩衝液を使用し、pH=4及び5の各緩衝液は酢酸緩衝液を使用し、pH=6及び7の緩衝液としてはリン酸緩衝液を使用し、pH=8の緩衝液としてはトリス-塩酸緩衝液を使用し、pH=9及び10の緩衝液としてはグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液を使用した。各緩衝液中の緩衝剤の濃度は0.1モル/Lとした。

各フェリクリシン溶液をネジ付き試験管に入れて試験管を密閉した後、温度120℃、圧力200kPaの条件で20分間加圧加熱殺菌した。加熱加圧殺菌の前後で、各溶液の430nmにおける吸光度を測定した。結果を以下の表13に示す。

【0085】

【表13】

pH	430nmにおける吸光度	
	加熱加圧前	加熱加圧後
2.0	0.709	0.366
3.0	0.742	0.721
4.0	0.738	0.743
5.0	0.732	0.748
6.0	0.743	0.746
7.0	0.764	0.774
8.0	0.758	0.747
9.0	0.765	0.767
10.0	0.769	0.772

表13から明らかなように、フェリクリシン溶液中のフェリクリシン濃度はpH=3.0~10.0の広いpH範囲において高圧加熱殺菌後も低下しなかった。このことから、フェリクリシ

ンは、pH=3.0~10.0の広いpH範囲において高い熱安定性を有することが分かる。

【産業上の利用可能性】

【0086】

本発明の鉄補給剤は、鉄欠乏性貧血を始めとする鉄欠乏による症状の予防、改善又は治療のために好適に使用できる。それ単独で使用する場合は、そのまま摂取することができ、又は、食品添加剤として使用することもできる。さらに、鉄欠乏性貧血を始めとする鉄欠乏による症状の予防、改善又は治療のための機能性食品又は医薬組成物の有効成分として使用することもできる。

【書類名】要約書

【要約】

【課題】 生体内への鉄の吸収率が高い鉄補給剤及び鉄補給用組成物を提供する。

【解決手段】 シデロフォアと3価鉄イオンとを含む鉄補給剤。本発明者は、シデロフォアと3価鉄イオンとの例えはキレート錯体は生体内への吸収率が高いことを初めて見出した。また、生体内に吸収されて、血中ヘモグロビン濃度及び肝臓における貯蔵鉄濃度を有意に増加させることも見出した。さらに、生体機能に悪影響を及ぼさないことも見出した。これらのことから、この鉄補給剤は、鉄欠乏性貧血の予防、改善又は治療のために好適に使用できる。

【選択図】なし

特願2004-007278

出願人履歴情報

識別番号 [000165251]

1. 変更年月日 1990年 8月13日

[変更理由]

住 所 京都府京都市伏見区南浜町247番地
氏 名 月桂冠株式会社

出証番号 出証特2005-3019939